

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年2月22日 (22.02.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/12813 A1

- (51) 国際特許分類<sup>6</sup>: C12N 15/30, (IKADAI, Hiromi) [JP/JP]; 〒080-0026 北海道帯広市西16条南6丁目45-27 エスレイアIX202 Hokkaido (JP).  
C07K 14/44, C12N 1/21, C07K 16/20 五十嵐郁男 (IGARASHI, Ikuo) [JP/JP]; 〒080-2472 北海道帯広市西22条南4-8-23 Hokkaido (JP). 鈴木直義 (SUZUKI, Naoyoshi) [JP/JP]; 〒164-0013 東京都中野区弥生町3-26-6 Tokyo (JP). 長澤秀行 (NAGASAWA, Hideyuki) [JP/JP]; 〒080-0836 北海道帯広市空港南町296-12 Hokkaido (JP). 藤崎幸蔵 (FUJISAKI, Kozo) [JP/JP]; 〒080-0838 北海道帯広市大空町12-4-3 大空町住宅301-203 Hokkaido (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP99/14386
- (22) 国際出願日: 13 Apr 01/20 1999年8月13日 (13.08.1999)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人化学及血清療法研究所 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒860-8568 熊本県熊本市大窪一丁目6番1号 Kumamoto (JP).
- (74) 代理人: 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.); 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): JP, US.
- (71) 出願人 および
- (72) 発明者: 見上 彪 (MIKAMI, Takeshi) [JP/JP]; 〒080-0838 北海道帯広市大空町12-4-3 大空町住宅302-301 Hokkaido (JP).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 笹井宏実
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GENE ENCODING MEROZOITE PROTEIN OF BABESIA CABALLI, RECOMBINANT PROTEIN OBTAINED THEREFROM AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称: バベシア・カバリのメロゾイトのタンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子より得られる組換えタンパク質、およびその利用

(57) Abstract: A gene encoding merozoite protein of *Babesia caballi*; a recombinant protein of the merozoite protein of *Babesia caballi*; and an antibody capable of binding specifically to a 48 kDa protein of merozoite rhoptry of *Babesia caballi*. Thus, the 48 kDa protein of merozoite rhoptry of *Babesia caballi* and a gene encoding this protein can be stably produced on a mass scale by recombinant DNA techniques. A method for diagnosing equine babesiosis by specifically detecting *Babesia caballi* antibody in equine blood by using the above-mentioned recombinant protein as an antigen or by specifically detecting *Babesia caballi* merozoite in equine blood by using the above-mentioned antibody.

/続葉有/

WO 01/12813 A1



---

(57) 要約:

本発明は、バベシア・カバリのメロゾイトのタンパク質をコードする遺伝子、バベシア・カバリのメロゾイトの組換えタンパク質、およびバベシア・カバリのメロゾイトのロプトリーの48 kDaタンパク質と特異的に結合しうる抗体を提供する。本発明により、バベシア・カバリのメロゾイトのロプトリーの48 kDaタンパク質および該タンパク質をコードする遺伝子を組換えDNA技術により、大量かつ安定に生産することが可能となる。本発明はまた、本発明の組換えタンパク質を抗原として用いてウマ血液中のバベシア・カバリ抗体を特異的に検出するかまたは本発明の抗体を用いてウマ血液中のバベシア・カバリのメロゾイトの存在を検出することによる、ウマバベシア病の診断方法をも提供する。

## 明 細 書

バベシア・カバリのメロゾイトのタンパク質をコードする遺伝子、該遺伝子より得られる組換えタンパク質、およびその利用

技術分野

- 5       本発明は、ウマバベシア原虫の一種であるバベシア・カバリ (*Babesia caballi* ; 以下、「BC」ともいう) のメロゾイトに由来するタンパク質、それをコードする遺伝子、該タンパク質に特異的な抗体およびそれらを用いたウマバベシア病の診断方法に関する。

背景技術

- 10       ウマバベシア病はダニが媒介する原虫病であり、病原体であるウマバベシア原虫はバベシア属に属するバベシア・カバリおよびバベシア・エクイ (*Babesia equi* ; 以下、「BE」ともいう) の2種類が知られている。

- 15       ウマバベシア病は、南ヨーロッパ、アジア、ロシア、中近東、アフリカおよび中南米など世界中に広く分布している。本病は临床上、高熱を発し、貧血および黄疸を主徴とし、急性ないし慢性に経過する。急性症の場合、その死亡率は2種類ある病原体によって若干異なるが、約10%、まれには50%に達することもあるといわれている。一方、予後は病原体により症状が異なり、いずれも耐過後は末梢血液中から原虫が消失するが、BEの場合は終生原虫保有ウマとなることが知られている。

- 20       近年の国際的なウマの取引きの増加は、清浄国である北アメリカ、オーストラリア、および日本を含む極東への本病の拡散の可能性を含んでいることから、早期診断による感染ウマの摘発が極めて重要となっている。このように感染が認められたウマについては拡散防止のために殺処分されることになるが、上記のようにBC感染の場合は、感染後に原虫が消失することから、BC感染ウマは隔離、  
25       係留しておけば殺処分をしなくて済むケースがある。また、感染原虫種により治療法も異なってくる。従って、いずれの種のバベシア原虫に感染しているかを正確に診断することは、特に高価な競争馬においては重要な問題となっている。

      ウマバベシア原虫の生活史はマラリア原虫と類似している。すなわち、宿主の血液に入った種虫 (スポロゾイト ; sporozoite) は直ちに赤血球に侵入しメロゾ

イト (merozoite) となる。メロゾイトは赤血球中でさらに分裂 (シゾント ; schizont) して数を増す。赤血球の破壊に伴いメロゾイトは放出され、他の赤血球に感染する。メロゾイトが寄生している赤血球を媒介者であるマダニが吸血によって摂取すると、マダニ腸管内でメロゾイトのうちある個体は配偶子母細胞となり、有性的な配偶子を形成する。こうして形成された雌雄の配偶子の合体によって生じたチゴート (zygote) は、マダニ腸細胞内に侵入し、スポロキネート (sporokinete) を経た後、マダニ体内の各臓器内でさらに分裂して、最終的にマダニ唾液腺に到って多数の種虫となり、新たな感染を引き起こす。

ウマバベシア病の感染の診断は、通常、上記ウマバベシア原虫の生活史のうち、ウマ血中に存在するメロゾイトまたはそれに対する抗体を検出することにより行う。

ウマバベシア病の感染の診断には、現在のところ、主に補体結合反応 (以下、「CF」ともいう) と間接蛍光抗体法 (以下、「IFA」ともいう) が用いられているが、検出感度が低いことから感染初期やキャリアー状態のウマを見逃すおそれが指摘されている。また、これらの血清学的診断法は特異性の点でも問題を伴うことが多い。

さらに、これらの診断法は、本病に感染したウマの血液より分離した原虫を抗原として利用したものであるため、抗原の作製コストおよびその品質のバラツキが問題となる。特にBCについては、感染したウマは原虫の増殖がまだ低い段階でも発熱・貧血を主徴とする激烈な症状を呈して死亡してしまうため、抗原の入手が極めて困難であり、安定した診断法の確立が妨げられている。

CFやIFAに代わる診断法として、近年、ウエスタンブロット法 [Int. J. Parasitol. 22(5): 627-630 (1992)]、ELISA [Vet. Parasitol. 20: 43-48 (1986) ; Int. J. Parasitol. 24(3): 341-346 (1994) ; Vet. Parasitol. 68: 11-26 (1997)]、DNAプローブを用いた方法 [Parasitology 102: 357-365 (1991) ; Vet. Parasitol. 73: 53-63 (1997)] が報告されている。しかしながら、ウエスタンブロット法では検出感度の点、ELISAではBEとの類症鑑別における特異性の点あるいは抗原入手の困難性の点、DNAプローブ

を用いた方法ではオートラジオグラフィーなど特殊な機器を必要とする点等で問題があり、更なる改善が必要な状況にある。

以上のことから、特異性に優れるBC原虫の有用な診断用抗原を安定して供給することを可能にする技術を開発することが、本病を予防、制圧する上で重要な課題と考えられる。

#### 発明の開示

かかる状況下、本発明者らは、BCの虫体抗原を大量に生産する方法を開発すべく遺伝子組換えによる方法について鋭意研究を重ねた結果、かかる目的に有用なBCのタンパク質をコードする遺伝子を単離精製することに成功した。該遺伝子を用いれば、BCの虫体タンパク質を組換えDNA技術により大量に生産することができる。

すなわち、本発明は、バベシア・カバリのメロゾイトのタンパク質をコードする遺伝子、バベシア・カバリのメロゾイトの組換えタンパク質、バベシア・カバリのメロゾイトのロプトリー（rhoptry）（放出体（extrusome）の一種）の48 kDaタンパク質と特異的に結合しうる抗体、該組換えタンパク質を抗原として用いてウマ血液中のバベシア・カバリ抗体を特異的に検出することを特徴とするウマバベシア病の診断方法、および該抗体を用いてウマ血液中のバベシア・カバリのメロゾイトの存在を検出することを特徴とするウマバベシア病の診断方法を提供するものである。

本発明の第一の側面は、BCのメロゾイトのロプトリーの48 kDaタンパク質をコードする遺伝子に関する。本発明の遺伝子は、配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質、または当該アミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつBCのメロゾイトのロプトリーの48 kDaタンパク質より誘導される抗体または抗血清に対して免疫学的活性を有するタンパク質をコードするものである。

本発明の遺伝子は、好ましくは、配列番号1に示す塩基配列を有する。本発明の遺伝子はまた、配列番号1に示す塩基配列に相補性を有する塩基配列にハイブリダイズし、かつBCのメロゾイトのロプトリーの48 kDaタンパク質より誘導される抗体または抗血清に対して免疫学的活性を有するタンパク質をコードす

る塩基配列を有するものである。

本発明の遺伝子およびその断片はまた、DNAプローブ法やPCR法を用いることによりウマバベシア病の診断に適用することも可能である。

5 本発明の第二の側面は、バベシア・カバリのメロゾイトの組換えタンパク質に関する。本発明の組換えタンパク質は、好ましくは、配列番号2に示すアミノ酸配列からなるものである。本発明の組換えタンパク質はまた、配列番号2に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつバベシア・カバリのメロゾイトのロプトリーの48 kDa タンパク質より誘導される抗体または抗血清に対して免疫学的活性を有するものである。

10 本発明の組換えタンパク質は、たとえば、配列番号2に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するcDNAを組み込んだDNAベクターによって形質転換された宿主より発現させることができる。本発明の組換えタンパク質はまた、配列番号2に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するcDNAを組み込んだファージを大腸菌に感染させて調製した組換えファージ溶原菌より発現させることができる。

15 本発明の第三の側面は、バベシア・カバリのメロゾイトのロプトリーの48 kDa タンパク質と特異的に結合しうる抗体に関する。本発明の抗体が結合するバベシア・カバリのメロゾイトのロプトリーの48 kDa タンパク質は、天然由来であっても組換えにより製造されたものであってもよい。本発明の抗体はモノクローナル抗体であることが好ましい。このようなモノクローナル抗体としては、以下に記載するBC11DとBC233Dが挙げられる。

20 本発明の第四の側面は、上記バベシア・カバリのメロゾイトの組換えタンパク質からなる抗原に関する。該抗原はウマ血液中のバベシア・カバリ抗体を特異的に検出するために用いることができ、かくしてウマバベシア病を診断することができる。すなわち、本発明の第五の側面は、該組換えタンパク質を抗原として用いてウマ血液中のバベシア・カバリ抗体を特異的に検出することを特徴とするウマバベシア病の診断方法に関する。

25 本発明の第六の側面は、本発明の抗体を用いてウマ血液中のバベシア・カバリ

のメロゾイトの存在を検出することを特徴とするウマバベシア病の診断方法に関する。

ウマバベシア病の具体的な診断方法としては、E L I S A、イムノクロマト法や凝集法等が挙げられる。

- 5       なお、本明細書中に引用した特許、刊行物、文献はすべて、参照のため本明細書中に引用される。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明のモノクローナル抗体 B C 1 1 D のバベシア・カバリに対する反応性を示す共焦点レーザー顕微鏡像を示す写真である。

- 10       図 2 は、配列番号 1 に示す塩基配列を有する、B C のメロゾイトのロプトリーの 4 8 k D a タンパク質をコードする c D N A クローン B C 4 8 を組み込んだ p G E X / B C 4 8 の構築を示す模式図である。

- 15       図 3 は、ファージクローン B C 4 8 由来溶原菌より発現されたタンパク質と、B C メロゾイト 4 8 k D a を認識するモノクローナル抗体 B C 1 1 D との反応性を示すウエスタン・ブロット像を示す写真である。

#### 発明を実施するための最良の形態

- 本発明の B C のメロゾイトのロプトリーの 4 8 k D a タンパク質をコードする遺伝子は、たとえば以下の方法によって得ることができる。すなわち、Avarzed らの方法 [J. Vet. Med. Sci. 5 9 ( 6 )、4 7 9 ~ 4 8 1 ( 1 9 9 7 ) ] に従い、  
20       in vitro 培養により B C 感染赤血球 ( 赤血球内寄生率 : 約 1 0 % ) を得る。次に、Chomczynski らの方法 [Anal. Biochem. 1 6 2、1 5 6 - 1 5 9 ( 1 9 8 7 ) ] に従い、グアニジニウムフェノールクロロホルム法によりトータル R N A を抽出し、oligotex-dT 30 (Takara 社製) により m R N A を分離精製した後、Zap-  
25       cDNA 合成キット (Stratagene Inc. 製) を用いて c D N A を合成する。この c D N A を  $\lambda$  Zap II ファージベクター (Stratagene Inc. 製) に挿入後、Gigapack III パッケージングシステム (Stratagene Inc. 製) を用いパッケージングし、  
c D N A ライブラリーを構築する。得られた c D N A ライブラリーは、B C メロゾイト 4 8 k D a タンパク質を認識するモノクローナル抗体を用いてイムノスクリーニングを行い、c D N A クローンを得る。この c D N A クローンを in vivo

エキシジョンによりpBluescriptクローンとして回収する。

このようにして得られたクローンのcDNAインサートの塩基配列を、たとえばSangerらのダイデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] を用いてヌクレオチド配列を決定する。以上のようにして得られたcDNAのヌクレオチド配列は、配列番号1に示すように全長1,828塩基対であり、配列番号1または2に示すBCメロゾイト48kDaタンパク質のアミノ酸配列に対応する構造遺伝子全長1,374塩基対を含んでいる。上記のようにして得られるcDNAは、そのまま、または5'末端を修飾した上で公知の発現ベクター中に公知の方法によりプロモーターの下流に挿入する。ついで、上記cDNAを挿入した発現ベクターを、大腸菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞等、公知の細胞中に公知の方法により導入することができる。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、バベシア・カバリのメロゾイトのロプトリーの48kDaタンパク質および該タンパク質をコードする遺伝子を組換えDNA技術により、大量かつ安定に生産することが可能となる。本発明の遺伝子、または上記のように本発明の遺伝子を導入した細胞から得られるタンパク質およびそれらの一部からなるポリペプチドは、ウマ血液中のBCのメロゾイト抗体を検出するための抗原として用いることによりウマバベシア病の診断に用いることができる。かくして得られたタンパク質およびそれらの一部からなるポリペプチドはまた、BCのメロゾイト抗体、とりわけBCのメロゾイトに対するモノクローナル抗体を作製するための抗原としても用いることができ、かくして作製された抗体はウマ血液中のBCのメロゾイトを特異的に検出することによりウマバベシア病の診断に用いることができる。

#### 実施例

以下に、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

#### 実施例1：バベシア・カバリのメロゾイトのcDNAライブラリーの構築

BC感染赤血球（赤血球内寄生率：約10%）は、Avarzedらの方法 [J. Vet. Med. Sci. 59(6), 479~481 (1997)] に従い、in vitro培養によ



り得た。すなわち、BC (USDA株) 感染ウマより抗凝固剤としてEDTAを含むチューブに採取した血液を、10mM HEPES加RPMI 1640培地で遠心洗浄し、buffy coatを除いた。遠心洗浄後、上清を除去し、沈渣の50 $\mu$ lを40%ウマ血清加RPMI 1640培地(2mM L-グルタミン、50 $\mu$ l正常ウマ赤血球含)の1mlの比率で混合し、24穴マイクロプレートに1穴あたり1mlずつ分注した。マイクロプレートは5%CO<sub>2</sub>、2%O<sub>2</sub>、93%N<sub>2</sub>、37℃の条件下で培養した。培養中、毎日、新鮮培地と交換し、ギムザ染色により寄生率を測定しながら適宜継代を行った。

このようにして得られたBC感染赤血球からのcDNAライブラリーの構築は、筏井らの報告[第126回日本獣医学会講演要旨集、191頁、(1998)]に示す方法で行われた。すなわち、得られたBC感染赤血球から、Chomczynskiらの方法[Anal. Biochem. 162、156-159(1987)]に従い、グアニジニウムフェノールクロロホルム法によりトータルRNAを抽出し、oligotex-dT 30 (Takara社製)によりmRNAを分離精製した後、Zap-cDNA合成キット(Stratagene Inc. 製)を用い、該キットに添付のプロトコールに従ってcDNAを合成した。このcDNAを $\lambda$  Zap IIファージベクター(Stratagene Inc. 製)に挿入後、Gigapack IIIパッケージングシステム(Stratagene Inc. 製)を用い、該キットに添付されているプロトコールに従ってパッケージングし、cDNAライブラリーを構築した。

**実施例2：バベシア・カバリのメロゾイトの48kDa抗原を認識するモノクローナル抗体の作出**

免疫原として、リン酸緩衝食塩液0.1mlあたりBC感染ウマより得られたメロゾイトの $1 \times 10^8$ 個を含むように調製された浮遊液をフロイントの完全アジュバント(Difco社製)とともに乳化したものを、7週齢メスのBALB/cマウスの腹腔内および皮下に、1匹あたり0.2mlを接種した。追加免疫として、同量のメロゾイトをフロイントの不完全アジュバント(Difco社製)とともに乳化したものを2週間間隔で3回接種した。4回目免疫から3日後、メロゾイトを静注し、さらに3日後に解剖し脾臓を摘出した。脾臓細胞はポリエチレングリコール(PEG 1500、Boehringer Mannheim Biochemica社製)によりSp

ー2マウスミエローマ細胞と融合させた。

ハイブリドーマ細胞は、HAT培地 (Boehringer Mannheim Biochemica社製) およびBri Clone (BioResearch社製) 添加GIT培地 (Wako社製) を用い、定法に従い選別された。各ハイブリドーマは、培養上清について、冷アセトン固定BC感染赤血球塗抹標本を用いた間接蛍光抗体法によりスクリーニングしたところ、6種のクローンが得られた。このうち2種のハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体は、BCメロゾイト可溶化抗原を用いたウェスタンブロット法により、同一の48 kDa抗原を認識することが判明し、これらをBC11DとBC233とした。BC11DとBC233Dの産生するモノクローナル抗体は、ウェスタンブロットにおいて、ともにBEおよび非感染ウマ赤血球には反応しないことが確認された。これら48 kDaを認識するモノクローナル抗体は共焦点レーザー顕微鏡での観察により、ロプトリーを認識するものであった (図1)。このようにして得られたハイブリドーマクローンが産生するモノクローナル抗体のサブクラスおよびL鎖型については、Amersham isotyping kit (Amersham社製) を用いて決定され、それぞれIgG2aとIgG1であった。

**実施例3** : BCのメロゾイトのcDNAライブラリーのスクリーニングおよびcDNAクローンのシーケンシング

一次抗体として実施例2で得られた48 kDaタンパク質を認識するBC11Dの産生するモノクローナル抗体培養上清を1%牛血清アルブミン加PBSにより5倍希釈したものを、二次抗体として該一次抗体に結合可能なアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc. 製) を1%牛血清アルブミン加PBSにより20,000倍希釈したものを、実施例1で得られたcDNAライブラリーをイムノスクリーニングすることで陽性ブランクを回収し、クローニングを行った。得られたcDNAクローンBC48をin vivoエキシジョンによりpBluescript SK (+) プラスミドベクター (Stratagene Inc. 製) に挿入し、その後、各cDNAを制限酵素で切断し、サブクローニングした。挿入DNAはM13リバーズおよびユニバーサルプライマー (Stratagene Inc. 製) を用いたダイプライマー法により、ABI PRISMTM 377シーケンサー (Perkin Elmer社製) を用いてヌクレオチド配列を決定した。

シークエンスデータはGene Works (IntelliGenetics, Inc. 製) を用いて解析された。その結果、BCのメロゾイト48 kDa 抗原をコードする遺伝子のヌクレオチド配列は、配列番号1に示す通り、全長1,828塩基対であり、配列番号1に示すBCメロゾイト48 kDa タンパク質のアミノ酸配列に対応する構造遺伝子全長1,374塩基対を含んでいることがわかった。

なお、上記cDNAクローンBC48がプラスミドベクターpGEX4T-3に組み込まれたpGEX/BC48は、大腸菌にトランスフェクション後、Escherichia coli /GST-BC48として、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566））にて1999年6月16日に受託番号：FERM BP-6761として寄託されている。

#### 実施例4：組換えBCメロゾイトタンパクの作製

次にpBluescript SK (+) プラスミドベクターに挿入されているcDNAを、制限酵素、EcoRIとXhoIで切り出し、pGEX4T-3プラスミドベクター（Pharmacia Biochemicals Inc. 製）のEcoRIとXhoIサイトに挿入した（図2）。このプラスミドベクターを、大腸菌（BL21株）にトランスフェクトし、定法に従いイソプロピル- $\beta$ -D-チオ-ガラクトピラノシド（IPTG）で誘導し発現させた。

発現させた大腸菌の菌液500mlを4℃にて6,000rpmで10分間遠心を行った後、上清を捨てた。沈渣を10mlの sonication buffer（50mM Tris-HCl(pH8.0)/50mM NaCl/1mM EDTA）に懸濁し、超音波処理により菌体を破碎した。破碎菌体液に10% TritonX-100 を最終濃度が1%になるように添加後、4℃にて12,000rpmで30分間遠心を行い、上清を回収した。回収した上清にグルタチオンセファローズ4Bビーズ（Glutathione sepharose 4B beads; Pharmacia Biochemicals Inc. 製）50%スラリーの0.2mlを加え、4℃にて30分間混和した後、4℃にて3,000rpmで10分間遠心し、上清を捨てた。0.5% TritonX-100 を添加PBS（PBST）1mlで混和した後、4℃にて5,000rpmで10秒間遠心し、上清を捨て洗浄した。同様の操作を2回繰り返し洗浄を行った。トロンビン分散

用緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH 8.0) / 150 mM NaCl / 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) 1 ml を加え、混和後、4℃にて5,000 rpmで10秒間遠心し、上清を捨てた。最終濃度20 Uのトロンビンを含む分散用緩衝液の0.5 ml を加え、4℃にて一夜混和した。4℃にて3,000 rpmで10分間遠心した後、  
5 上清を回収したものを組換えタンパク質とした [Schelpら、Appl. Parasitol. 36、1~10 (1995) 参照]。

得られた組換えタンパク質はニトロセルロースメンブラン (Hybond<sup>TM</sup>-C extra, Amersham) にブロッティングした後、一次抗体として実施例2で作製したBC11Dが産生するモノクローナル抗体を、二次抗体として該一次抗体に結合可能な  
10 ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc. 製) を用いたウエスタンブロット法を実施した。その結果、実施例2で作製したBC11Dが産生するモノクローナル抗体と反応することが確認され、発現タンパク質の分子量は、BC原虫由来の分子量48 kDa タンパク質と一致していた (図3)。

15 **実施例5：組換え抗原を用いたELISAによるBCおよびBEの類症鑑別**

ELISAはTakumiらの報告 [Jpn. J. Vet. Sci. 52(2)、241~250 (1990)] を参考に行った。すなわち、実施例4で得られた発現タンパク質を0.05 M炭酸重炭酸バッファー (pH 9.6) で希釈し、96穴ELISA用プレートに50  $\mu$  l / 穴ずつ分注し、4℃にて一晩、固相化した。固相化終了後、  
20 0.05 % Tween20添加PBSで1回洗浄し、3 % スキムミルク添加PBSを100  $\mu$  l / 穴ずつ分注し、37℃にて60分間ブロッキングした。ブロッキング終了後、プレートを0.05 % Tween20添加PBSで1回洗浄した。次に、3 % スキムミルク添加PBSで1 / 80倍希釈した検体を50  $\mu$  l / 穴ずつ分注し、37℃にて60分間反応させた。なお、検体は、日本中央競馬会競走馬総合研究所  
25 において、BCまたはBEを実験的に感染させたウマより得られた血清、並びにBCおよびBE非感染ウマ血清を用いた。反応終了後、0.05 % Tween20添加PBSで6回洗浄し、3 % スキムミルク添加PBSで1 / 4,000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗ウマIgG抗体 (Cappel社製) を50  $\mu$  l / 穴ずつ分注し、37℃にて60分間反応させた。反応終了後、0.05 % Tween20添加PBSで6

回洗浄し、基質液として、0.1Mクエン酸、0.2Mリン酸ナトリウム、0.03%過酸化水素水、および0.3mg/mlの2,2'-アジノービス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (Sigma社製) を溶解したものを100μl/穴ずつ分注し、室温にて60分間反応させた。反応終了後、波長415nmにおける各穴の吸光度を測定した。その結果を表1に示した。

表1

BCおよびBE非感染ウマ血清ELISA値	BE実験感染ウマ血清ELISA値	BC実験感染ウマ血清ELISA値
0.039	0.018	0.319
0.021	0.032	0.541
0.003	0.045	0.805
0.014	0.033	0.700
0.029		0.721
0.020		
0.068		
0.017		

ここで、BC陰性ウマ血清を検体としたELISA実施結果より、本ELISA法では陽性限界は0.2であることが明らかとなっている。ELISAの結果、該抗原を用いたELISAでは、BCおよびBE非感染ウマ血清、およびBE感染ウマ血清では、ELISA値がいずれも0.2以下であったのに対し、BC感染ウマ血清ではELISA値が0.319~0.805を示し、その特異性が確認された。

## 請 求 の 範 囲

1. バベシア・カバリ (*Babesia caballi*) のメロゾイトのタンパク質をコードする遺伝子。

2. 当該タンパク質が、配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質、または当該アミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつバベシア・カバリのメロゾイトのロプトリーの 48 kDa タンパク質より誘導される抗体または抗血清に対して免疫学的活性を有するタンパク質である請求項 1 に記載の遺伝子。

3. 配列番号 1 に示す塩基配列、または当該塩基配列に相補性を有する塩基配列にハイブリダイズし、かつバベシア・カバリのメロゾイトのロプトリーの 48 kDa タンパク質より誘導される抗体または抗血清に対して免疫学的活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を有する請求項 1 または 2 に記載の遺伝子。

4. バベシア・カバリのメロゾイトの組換えタンパク質。

5. 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるか、または当該アミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつバベシア・カバリのメロゾイトのロプトリーの 48 kDa タンパク質より誘導される抗体または抗血清に対して免疫学的活性を有する、請求項 4 に記載の組換えタンパク質。

6. 配列番号 2 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する cDNA を組み込んだ DNA ベクターによって形質転換された宿主より発現される、請求項 4 または 5 に記載のタンパク質。

7. 配列番号 2 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する cDNA を組み込んだファージを大腸菌に感染させて調製した、バベシア・カバリのメロゾイトのロプトリーの 48 kDa タンパク質を発現する組換えファージ溶原菌。

8. バベシア・カバリのメロゾイトのロプトリーの 48 kDa タンパク質と特異的に結合しうる抗体。

9. 当該タンパク質が天然由来もしくは組換えタンパク質である請求項 8 に記載の抗体。

10. モノクローナル抗体である請求項 8 または 9 に記載の抗体。

1 1. 請求項 4 から 6 のいずれかに記載のバベシア・カバリのメロゾイトの組換えタンパク質からなる抗原。

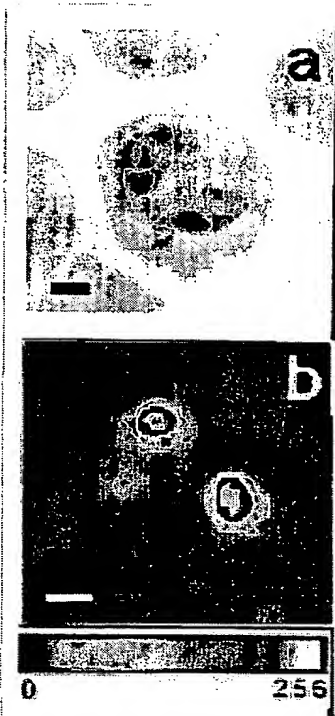
1 2. 請求項 1 1 に記載の抗原を用いてウマ血液中のバベシア・カバリ抗体を特異的に検出することを特徴とするウマバベシア病の診断方法。

5 1 3. バベシア・カバリのメロゾイトののロプトリーの 48 kDa タンパク質と特異的に結合しうる抗体を用いてウマ血液中のバベシア・カバリのメロゾイトの存在を検出することを特徴とするウマバベシア病の診断方法。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



図 1



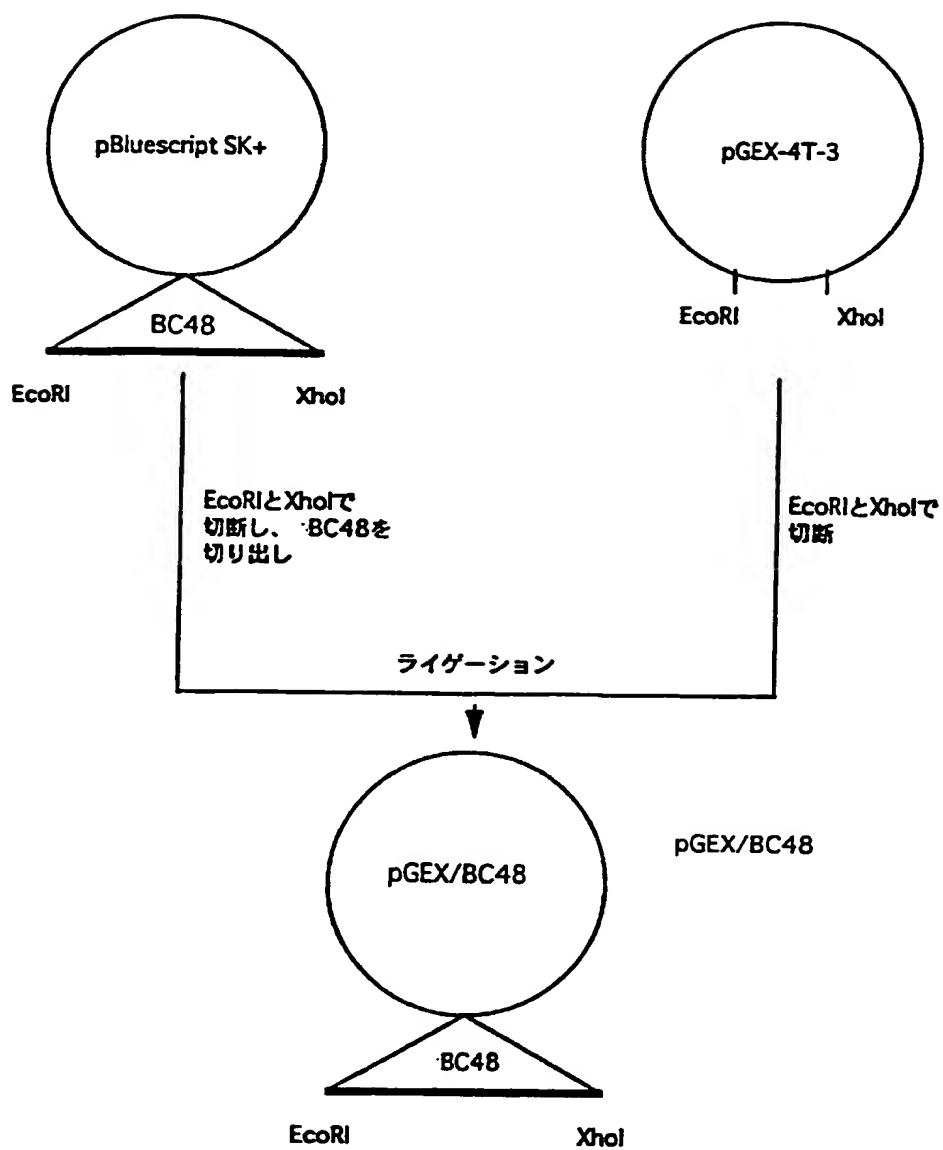
モノクローナル抗体BC11Dのバベシア・カバリに対する  
反応性を示す共焦点レーザー顕微鏡像

a : バベシア・カバリギムザ染色像

b : バベシア・カバリ共焦点レーザー顕微鏡像

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

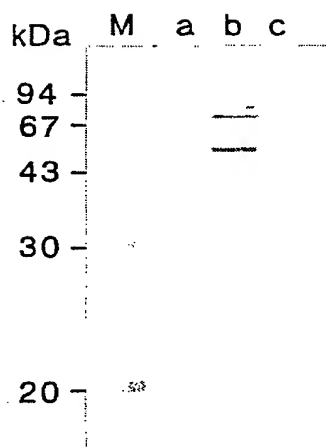
図 2



p G E X / B C 4 8 構築

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 3



バベシア・カバリ メロゾイト 48 kDa を認識するモノクローナル抗体 BC11D を用いた、ファージクローン λ BC48 由来溶原菌発現タンパク質 BC48 のウエスタン・ブロット像

a : バベシア・カバリ可溶化メロゾイト抗原  
b : 発現タンパク質 BC48 (発現 GST 融合タンパク質の GST を切り放した精製タンパク質)

c : *E. coli* (BL21 株)

M : マーカ

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## SEQUENCE LISTING

<110> The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute

<120> A DNA coding for merozoite protein of Babesia caballi, a recombinant protein obtained by using said DNA and a use thereof

<130> 661440

<160> 2

<210> 1

<211> 1828

<212> DNA

<213> Babesia caballi

<400> 1

GTGCCCTGGC CGTTCGCCAC AACAGCCGTG TTTCCATC ATG GCT CCC AGC GAC TCT	56
Met Ala Pro Ser Asp Ser	
1 5	
GTG GGC GAC GTG ACT AAG ACC TTA TTG GCT GCC AGC GAA AGT GTG GAC	104
Val Gly Asp Val Thr Lys Thr Leu Leu Ala Ala Ser Glu Ser Val Asp	
10 15 20	
TCA GCT GCC AAT GCC TAT ATG ATC AAC AGT GAC ATG AGC GAT TAC TTG	152
Ser Ala Ala Asn Ala Tyr Met Ile Asn Ser Asp Met Ser Asp Tyr Leu	
25 30 35	
TCG GCT GTG TCT GAC AAC TTC GCC GAG CGC ATT TGC AGT CAG GTC CCT	200
Ser Ala Val Ser Asp Asn Phe Ala Glu Arg Ile Cys Ser Gln Val Pro	
40 45 50	
AAG GGG AGT AAC TGC AGT GCT TCC GTT AGC GCA TAC ATG AGT CGC TGC	248
Lys Gly Ser Asn Cys Ser Ala Ser Val Ser Ala Tyr Met Ser Arg Cys	
55 60 65 70	
GCT AAA CAG GAC TGC CTG ACT CTC CAA AGT CTT AAG TAC CCT CTT GAG	296
Ala Lys Gln Asp Cys Leu Thr Leu Gln Ser Leu Lys Tyr Pro Leu Glu	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



75	80	85	
GCT AAG TAC CAA CCG CTG ACC CTT CCT GAC CCC TAC CAG TTG GAG GCC			344
Ala Lys Tyr Gln Pro Leu Thr Leu Pro Asp Pro Tyr Gln Leu Glu Ala			
90	95	100	
GCA TTT ATA CTC TTC AAG GAG AGT GAC GCT AAT CCG GCC AAT AGC ACT			392
Ala Phe Ile Leu Phe Lys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Ala Asn Ser Thr			
105	110	115	
GAG AAG CGC TTC TGG ATG CGT TTC AGA AGG GGC AAG AAC CAC AGT TAC			440
Glu Lys Arg Phe Trp Met Arg Phe Arg Arg Gly Lys Asn His Ser Tyr			
120	125	130	
TTC CAC GAC TTA GTC TTC AAT CTG CTG GAG AAG AAC GTG ACT CGC GAC			488
Phe His Asp Leu Val Phe Asn Leu Leu Glu Lys Asn Val Thr Arg Asp			
135	140	145	150
GCG GAT GCT ACT GAC ATT GAG AAC TTT GCG TCC AGG TAC CTG TAC ATG			536
Ala Asp Ala Thr Asp Ile Glu Asn Phe Ala Ser Arg Tyr Leu Tyr Met			
155	160	165	
GCC ACG CTT TAC TAC AAG ACG TAC ACG AAT GTT GAT GAG TTC GGT GCT			584
Ala Thr Leu Tyr Tyr Lys Thr Tyr Thr Asn Val Asp Glu Phe Gly Ala			
170	175	180	
AGC TTC TTT AAC AAG TTG TCT TTC ACT ACT GGG TTG TTC GGC TGG GGC			632
Ser Phe Phe Asn Lys Leu Ser Phe Thr Thr Gly Leu Phe Gly Trp Gly			
185	190	195	
ATC AAG AGG GCA CTT AAG CAG ATT ATT CGC TCT AAC CTG CCC CTT GAC			680
Ile Lys Arg Ala Leu Lys Gln Ile Ile Arg Ser Asn Leu Pro Leu Asp			
200	205	210	
ATC GGG ACA GAA CAC AGC GTC AGT CGC CTG CAG CAC ATT ACG AGC AGT			728
Ile Gly Thr Glu His Ser Val Ser Arg Leu Gln His Ile Thr Ser Ser			
215	220	225	230
TAC AAG GAT TAC ATG GAT ACG CAG ATT CCT GCA CTG CCC AAG TTT GCG			776

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Tyr Lys Asp Tyr Met Asp Thr Gln Ile Pro Ala Leu Pro Lys Phe Ala	
235 240 245	
AAG CGT TTC TCC CTT ATG GTA GTG CAG AGG CTG CTG GCC ACC GTG GCT	824
Lys Arg Phe Ser Leu Met Val Val Gln Arg Leu Leu Ala Thr Val Ala	
250 255 260	
GGT TAC GTC GAC ACC CCG TGG TAT AAG AAG TGG TAC ATG AAG CTG AAG	872
Gly Tyr Val Asp Thr Pro Trp Tyr Lys Lys Trp Tyr Met Lys Leu Lys	
265 270 275	
AAC TTT ATG GTG AAC AGG GTG TTC ATT CCT ACA AAG AAG TTC TTC AAT	920
Asn Phe Met Val Asn Arg Val Phe Ile Pro Thr Lys Lys Phe Phe Asn	
280 285 290	
AAG GAA ATT CGT GAG CCT AGT AAG GCA TTA AAA GAA AAG GTG TCA ACC	968
Lys Glu Ile Arg Glu Pro Ser Lys Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Thr	
295 300 305 310	
GAC ACC AAG GAT TTA TTC GAG AAC AAA ATT GGG CAG GGT ACT GTG GAC	1016
Asp Thr Lys Asp Leu Phe Glu Asn Lys Ile Gly Gln Gly Thr Val Asp	
315 320 325	
TTC TTC AAT AAG GAA ATT CGT GAC CCT AGT AAG GCA TTA AAA GAA AAA	1064
Phe Phe Asn Lys Glu Ile Arg Asp Pro Ser Lys Ala Leu Lys Glu Lys	
330 335 340	
GTG TCA AAC GAC GCC AAG GAT TTA TTC GAG AAC AAA ATT GGG CAG GGT	1112
Val Ser Asn Asp Ala Lys Asp Leu Phe Glu Asn Lys Ile Gly Gln Gly	
345 350 355	
ACT GTG GAC TTC ATC AAT AAC GAA ATT CGT GAC CCT AGT AAG GCA TTA	1160
Thr Val Asp Phe Ile Asn Asn Glu Ile Arg Asp Pro Ser Lys Ala Leu	
360 365 370	
ATA AGA AAA GTG TCA ACG GGG GCC GAG GAT TTA TTC GAG AAC AAA ATT	1208
Ile Arg Lys Val Ser Thr Gly Ala Glu Asp Leu Phe Glu Asn Lys Ile	
375 380 385 390	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

GGG CAG GGT ACT GTG GAC TTC ATC AAT AAC GAA ATT CGT GAC CCT AGT 1256  
 Gly Gln Gly Thr Val Asp Phe Ile Asn Asn Glu Ile Arg Asp Pro Ser  
                     395                    400                    405  
 AAG GCA TTA ATA AGA AAA GTG TAC ACC GAG GCC GAT GAT TTA TTC GAG 1304  
 Lys Ala Leu Ile Arg Lys Val Tyr Thr Glu Ala Asp Asp Leu Phe Glu  
                     410                    415                    420  
 AAC AAA ATT GGG CAG GGT ACT GTG GAC TTC ATC AAT AAG GAA ATT CGT 1352  
 Asn Lys Ile Gly Gln Gly Thr Val Asp Phe Ile Asn Lys Glu Ile Arg  
                     425                    430                    435  
 GAC CCT AGT AAG GCA TTA ATA AGA AAA GTG TCT ACC GAG GCC GAT AAT 1400  
 Asp Pro Ser Lys Ala Leu Ile Arg Lys Val Ser Thr Glu Ala Asp Asn  
                     440                    445                    450  
 TTA TTG GAG AAA TAGGTTGCGA AGCCCCTGAG GAAGCACCGC AAGGGCAACG TTAGT 1457  
 Leu Leu Glu Lys  
 455  
 GACAGCGGGG AATCTGAGGA AATTTCCGGCT GTGGGTGAAT CTTTGGAATC CGACAACGAA 1517  
 ATGAAGACCC AGGAGTCAAT GAACTCGGAG AGTGCTTCTA CCGAACTCCC TTCTGAGGAG 1577  
 TCCGAGGAAG AGTCGGCTGC TATGGTTATT CAGCAGCCCA CCCTGGAGGA GGCCAGCCAG 1637  
 ATCGCATTGC CTGCTGAAGA AGACAGCTCA GAGTTGCAGG AAACCTCCGA CAACTATGAA 1697  
 GCCTCTCTCT AGTCACCTTT GACGTCCATC GCACTGCTCG GAGAATATAA AACGCATTGC 1757  
 TCGGTTGCAC TCTAGTTGTT AACAATGCAC AATTTAATGT TATAGTTGTT TTGAAAAAAA 1817  
 AAAAAAAAAA A 1828

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 458

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Babesia caballi

&lt;400&gt; 2

Met Ala Pro Ser Asp Ser Val Gly Asp Val Thr Lys Thr Leu Leu Ala

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

1 5 10 15  
Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Ala Ala Asn Ala Tyr Met Ile Asn Ser  
20 25 30  
Asp Met Ser Asp Tyr Leu Ser Ala Val Ser Asp Asn Phe Ala Glu Arg  
35 40 45  
Ile Cys Ser Gln Val Pro Lys Gly Ser Asn Cys Ser Ala Ser Val Ser  
50 55 60  
Ala Tyr Met Ser Arg Cys Ala Lys Gln Asp Cys Leu Thr Leu Gln Ser  
65 70 75 80  
Leu Lys Tyr Pro Leu Glu Ala Lys Tyr Gln Pro Leu Thr Leu Pro Asp  
85 90 95  
Pro Tyr Gln Leu Glu Ala Ala Phe Ile Leu Phe Lys Glu Ser Asp Ala  
100 105 110  
Asn Pro Ala Asn Ser Thr Glu Lys Arg Phe Trp Met Arg Phe Arg Arg  
115 120 125  
Gly Lys Asn His Ser Tyr Phe His Asp Leu Val Phe Asn Leu Leu Glu  
130 135 140  
Lys Asn Val Thr Arg Asp Ala Asp Ala Thr Asp Ile Glu Asn Phe Ala  
145 150 155 160  
Ser Arg Tyr Leu Tyr Met Ala Thr Leu Tyr Tyr Lys Thr Tyr Thr Asn  
165 170 175  
Val Asp Glu Phe Gly Ala Ser Phe Phe Asn Lys Leu Ser Phe Thr Thr  
180 185 190  
Gly Leu Phe Gly Trp Gly Ile Lys Arg Ala Leu Lys Gln Ile Ile Arg  
195 200 205  
Ser Asn Leu Pro Leu Asp Ile Gly Thr Glu His Ser Val Ser Arg Leu  
210 215 220  
Gln His Ile Thr Ser Ser Tyr Lys Asp Tyr Met Asp Thr Gln Ile Pro  
225 230 235 240

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Ala Leu Pro Lys Phe Ala Lys Arg Phe Ser Leu Met Val Val Gln Arg  
245 250 255

Leu Leu Ala Thr Val Ala Gly Tyr Val Asp Thr Pro Trp Tyr Lys Lys  
260 265 270

Trp Tyr Met Lys Leu Lys Asn Phe Met Val Asn Arg Val Phe Ile Pro  
275 280 285

Thr Lys Lys Phe Phe Asn Lys Glu Ile Arg Glu Pro Ser Lys Ala Leu  
290 295 300

Lys Glu Lys Val Ser Thr Asp Thr Lys Asp Leu Phe Glu Asn Lys Ile  
305 310 315 320

Gly Gln Gly Thr Val Asp Phe Phe Asn Lys Glu Ile Arg Asp Pro Ser  
325 330 335

Lys Ala Leu Lys Glu Lys Val Ser Asn Asp Ala Lys Asp Leu Phe Glu  
340 345 350

Asn Lys Ile Gly Gln Gly Thr Val Asp Phe Ile Asn Asn Glu Ile Arg  
355 360 365

Asp Pro Ser Lys Ala Leu Ile Arg Lys Val Ser Thr Gly Ala Glu Asp  
370 375 380

Leu Phe Glu Asn Lys Ile Gly Gln Gly Thr Val Asp Phe Ile Asn Asn  
385 390 395 400

Glu Ile Arg Asp Pro Ser Lys Ala Leu Ile Arg Lys Val Tyr Thr Glu  
405 410 415

Ala Asp Asp Leu Phe Glu Asn Lys Ile Gly Gln Gly Thr Val Asp Phe  
420 425 430

Ile Asn Lys Glu Ile Arg Asp Pro Ser Lys Ala Leu Ile Arg Lys Val  
435 440 445

Ser Thr Glu Ala Asp Asn Leu Leu Glu Lys  
450 455

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP99/04386

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/30, C07K14/44, C12N1/21, C07K16/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/30, C07K14/44, C12N1/21, C07K16/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
DDBJ, GenBank, EMBL, GENESEQ, Swiss-Prot, PIR, BIOSIS (DIALOG),  
WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. Clin. Microbiol., Vol. 37, No. 7 (July, 1999) Kappmeyer L.S. et al.; "Detection of equine antibodies to <i>Babesia cabelli</i> by recombinant <i>B. cabelli</i> rhostry-associated protein 1 in a competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay", p.2285-2290	1-13
X	Exp. Parasitol., Vol. 84, No. 1 (1996) Dlyrmple B.P. et al.; "A polymerase chain reaction method for the identification of genes encoding members of the Bv60/p58 family of rhostry protein homologues in the genus <i>Babesia</i> ", p.96-100	1-13
A	J. Protozool. Res., Vol. 8, No. 2 (1998) Xuan X. et al.; "Diagnosis of <i>Babesia caballi</i> infection in horses by polymerase chain reaction", p.85-89	1-13
A	Vet. Parasitol., Vol. 68, No. 1-2 (1997) Bruening A. et al.; "Monoclonal antibodies against <i>Babesia caballi</i> and <i>Babesia equi</i> and their application in serodiagnosis", p.11-26	4-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
22 September, 1999 (22. 09. 99)

Date of mailing of the international search report  
5 October, 1999 (05. 10. 99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/04386

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/30, C07K14/44, C12N1/21, C07K16/20

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/30, C07K14/44, C12N1/21, C07K16/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

DDBJ, GenBank, EMBL, GENESEQ, Swiss-Prot, PIR, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J. Clin. Microbiol., Vol. 37, No. 7 (1999. 7月) Kappmeyer L. S. et al. ; "Detection of equine antibodies to <i>Babesia cabelli</i> by recombinant <i>B. cabelli</i> rhoptry-associated protein 1 in a competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay", p. 2285-2290	1-13
X	Exp. Parasitol., Vol. 84, No. 1 (1996) Dirmple B. P. et al. ; "A polymerase chain reaction method for the identification of genes encoding members of the Bv60/p58 family of rhoptry protein homologues in the genus <i>Babesia</i> ", p. 96-100	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.09.99

国際調査報告の発送日

05.10.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝本 晶子

4 B

9 4 5 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J. Protozool. Res. , Vol. 8, No. 2 (1998) Xuan X. et al. ; "Diagnosis of <i>Babesia caballi</i> infection in horses by polymerase chain reaction", p. 85-89	1-13
A	Vet. Parasitol. , Vol. 68, No. 1-2 (1997) Bruening A. et al. ; "Monoclonal antibodies against <i>Babesia caballi</i> and <i>Babesia equi</i> and their application in serodiagnosis", p. 11-26	4-13

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04386

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/30, C07K14/44, C12N1/21, C07K16/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/30, C07K14/44, C12N1/21, C07K16/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DDBJ, GenBank, EMBL, GENESEQ, Swiss-Prot, PIR, BIOSIS (DIALOG),  
WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. Clin. Microbiol., Vol. 37, No. 7 (July, 1999) Kappmeyer L.S. et al.; "Detection of equine antibodies to <i>Babesia cabelli</i> by recombinant <i>B. cabelli</i> rhoptry-associated protein 1 in a competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay", p.2285-2290	1-13
X	Exp. Parasitol., Vol. 84, No. 1 (1996) Dlyrmp B.P. et al.; "A polymerase chain reaction method for the identification of genes encoding members of the Bv60/p58 family of rhoptry protein homologues in the genus <i>Babesia</i> ", p.96-100	1-13
A	J. Protozool. Res., Vol. 8, No. 2 (1998) Xuan X. et al.; "Diagnosis of <i>Babesia caballi</i> infection in horses by polymerase chain reaction", p.85-89	1-13
A	Vet. Parasitol., Vol. 68, No. 1-2 (1997) Bruening A. et al.; "Monoclonal antibodies against <i>Babesia caballi</i> and <i>Babesia equi</i> and their application in serodiagnosis", p.11-26	4-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
22 September, 1999 (22. 09. 99)

Date of mailing of the international search report  
5 October, 1999 (05. 10. 99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**